

## **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

### **Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

#### **«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

### **ΧΑΛΚΙΑ ΑΝΤΙΓΟΝΗ - ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

#### **«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΛΗΨΗΣ ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ»**

**ΛΑΡΙΣΑ 2017**

**«Η επίδραση της συμπληρωματικής λήψης λιποϊκού οξέος στο οξειδωτικό στρες κατά την άσκηση»**

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

---

1ος Επιβλέπων: Τζιαμούρτας Αθανάσιος, Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

---

2ος Επιβλέπων: Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

---

3ος Επιβλέπων: Στάγκος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιαμούρτα για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη κατά τη διάρκεια της υλοποίησης της παρούσης μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους υπόλοιπους καθηγητές που αποτελούσαν την τριμελή επιτροπή για τις πολύτιμες γνώσεις κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και την Δρ Γεωργακούλη Καλλιόπη για τη βοήθεια και τις συμβουλές της προς εμένα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την στήριξή της.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Χαλκιά Αντιγόνη - Βασιλική: Η επίδραση της συμπληρωματικής λήψης λιποϊκού οξέος στο οξειδωτικό στρες κατά την άσκηση (Με την επίβλεψη του κ. Αθανασίου Τζιαμούρτα, Καθηγητή)

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης α-λιποϊκού οξέος για 4 εβδομάδες σε δείκτες αντιοξειδωτικής κατάστασης κατά την ηρεμία και μετά από άσκηση σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD). Συμμετείχαν οκτώ άνδρες με έλλειψη του G6PD, οι οποίοι έλαβαν με τυχαία σειρά α-λιποϊκό οξύ (600mg/ημέρα) και εικονικό σκεύασμα με περίοδο έκπλυσης ενδιάμεσα 4 εβδομάδων. Σωματομετρικές και φυσιολογικές μετρήσεις, καθώς και μια δοκιμασία άσκησης σε δαπεδοεργόμετρο μέχρι εξάντλησης πραγματοποιήθηκαν πριν και μετά από τη χορήγηση της κάθε ουσίας (α-λιποϊκό οξύ και εικονικό σκεύασμα). Επιπλέον, πριν (ηρεμία), αμέσως μετά και μια ώρα μετά το τέλος της δοκιμασίας άσκησης γινόταν αιμοληψία για μετέπειτα προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), του ουρικού οξέος και της χολερυθρίνης στον ορό. Μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος, υπήρξε σημαντική αύξηση της TAC και της χολερυθρίνης στην ηρεμία. Ως απόκριση στην άσκηση, η TAC αυξήθηκε πριν και μετά τη λήψη και των δυο σκευασμάτων, ενώ η χολερυθρίνη μόνο μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος. Συμπερασματικά, η συμπληρωματική λήψη α-λιποϊκού οξέος για 4 εβδομάδες μπορεί να συμβάλλει στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας, τόσο στην ηρεμία όσο και ως απόκριση κατά την άσκηση, σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.

Λέξεις κλειδιά: Άσκηση, οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες, λιποϊκό οξύ, συμπλήρωμα διατροφής.

## ABSTRACT

Chalkia Antigoni-Vasiliki: The effect of lipoic acid supplementation on oxidative stress in exercise

(Under the supervision of Professor Athanasios Jamurtas)

The purpose of the present study was to investigate the effect of  $\alpha$ -lipoic acid supplementation for 4 weeks on indices of antioxidant status at rest and after exercise in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD). Eight men with G6PD deficiency participated and received in random order  $\alpha$ -lipoic acid (600mg/day) and placebo separated by a wash out period of 4 weeks. Somatometric and physiological measurements, and a treadmill exercise trial until exhaustion were performed before and after administration of each substance ( $\alpha$ -lipoic acid and placebo). Moreover, before immediately after and one hour post-exercise blood samplings were performed for later determination of total antioxidant capacity (TAC), uric acid and bilirubin in serum. After  $\alpha$ -lipoic acid supplementation, there was a significant increase in TAC and bilirubin at rest. As a response to exercise, TAC increased before and after both treatments, while bilirubin only after  $\alpha$ -lipoic acid supplementation. In conclusion, 4 weeks of alpha-lipoic acid supplementation may contribute to enhanced antioxidant defense, both at rest and in response to exercise, in individuals with G6PD enzyme deficiency.

**Key words:** *Exercise, oxidative stress, free radicals,  $\alpha$ -lipoic acid, dietary supplement.*

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT .....	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Λειτουργίες και έλλειψη του ενζύμου G6PD.....	9
1.2. Αντιοξειδωτική άμυνα και έλλειψη του G6PD.....	10
1.3. Σημασία της έρευνας .....	11
1.4. Ερευνητικές υποθέσεις .....	12
1.5. Στατιστικές υποθέσεις.....	12
1.6. Περιορισμοί της έρευνας .....	13
2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ .....	14
2.1. Έλλειψη του G6PD και επιδημιολογία αυτής.....	14
2.2. Πιθανές συνέπειες έλλειψης G6PD .....	14
2.3. G6PD και οξειδοαναγωγική κατάσταση.....	15
2.4. Άσκηση και οξειδωτικό στρες.....	18
2.4.1. Άσκηση και έλλειψη G6PD .....	18
2.5. Αντιοξειδωτικές ουσίες.....	19
2.5.1. α-Λιποϊκό οξύ .....	19

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	21
3.1. Συμμετέχοντες .....	21
3.2. Πειραματική διαδικασία .....	22
3.3. Σωματομετρικές αξιολογήσεις .....	23
3.4. Φυσική δραστηριότητα .....	23
3.5. Προσδιορισμός μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου .....	23
3.6. Αξιολόγηση απόδοσης κατά την άσκηση .....	24
3.7. Συλλογή και χειρισμός αίματος.....	24
3.8. Αναλύσεις μεταβολικών δεικτών .....	25
3.9. Στατιστική ανάλυση.....	26
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	32
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ .....	34
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	35
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: Βεβαίωση έγκρισης πρότασης για διεξαγωγή έρευνας.....	44
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: Έντυπο συναίνεσης δοκιμαζόμενου σε ερευνητική εργασία.....	45
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: Ερωτηματολόγιο υγείας .....	48
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV: Ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας (IPAQ).....	50

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b> Σωματομετρικά χαρακτηριστικά πριν και μετά τη λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος .....	28
<b>Πίνακας 2.</b> Φυσιολογικές παράμετροι και απόδοση κατά την άσκηση πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.....	29
<b>Σχήμα 1.</b> Απόκριση κατά την άσκηση της TAC στον ορό πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.....	30
<b>Σχήμα 2.</b> Απόκριση κατά την άσκηση του ουρικού οξέος ορού πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.....	30
<b>Σχήμα 3.</b> Απόκριση κατά την άσκηση της χολερυθρίνης ορού πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.....	31



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Λειτουργίες και έλλειψη του ενζύμου G6PD

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορική γλυκόζης (G6PD) αποτελεί το πρώτο και περιοριστικό ένζυμο στο μεταβολικό μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών και συμμετέχει στη μετατροπή του NADP σε NADPH, το οποίο αποτελεί αναγωγικό παράγοντα (Leopold et al., 2001; Frank et al., 2005). Το NADPH συμβάλλει στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτική προσβολή, καθώς διατηρεί την αντιοξειδωτική ουσία γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή (GSH) (Gaetani et al., 1996). Η GSH εξουδετερώνει τα βλαβερά αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Προκειμένου να αναγεννηθεί η GSH, απαιτείται η δράση του ενζύμου αναγωγάσης της GSSG, η οποία απαιτεί NADPH ως αναγωγικό μέσο (Leopold et al., 2001).

Σύμφωνα και με τα παραπάνω, έχει γίνει κατανοητό ότι το G6PD αποτελεί αντιοξειδωτικό ένζυμο, αφού συμβάλλει στην άμυνα των κυττάρων κατά του οξειδωτικού στρες (Leopold et al., 2001). Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος του στα ερυθροκύτταρα αφού, λόγω της απουσίας μιτοχονδρίων, το G6PD η μοναδική πηγή NADPH. Επομένως, η μειωμένη δραστηριότητα του G6PD καθιστά τα ερυθροκύτταρα είναι πιο ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να προκαλέσει ρήξη της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων με συνέπεια την αιμόλυση. Διάφορες καταστάσεις στρες μπορούν να επιφέρουν μια τέτοια συνέπεια, μεταξύ των οποίων είναι η κατανάλωση κουκιών αλλά και ορισμένων φαρμάκων (Kwok et al., 2002; Lim et al., 2005).

Ο χρόνος ημιζωής του G6PD στα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα είναι περίπου 60 ημέρες. Η δραστηριότητα του ερυθροκυτταρικού G6PD εξαρτάται από την ηλικία του ερυθροκυττάρου. Επομένως, η δραστηριότητα του G6PD πιθανώς μπορεί να θεωρηθεί ως

δείκτης της ηλικίας των ερυθροκυττάρων (Piomelli et al., 1968; Beutler 1988, Marks & Johnson, 1958).

Η έλλειψη του G6PD αποτελεί την πιο συνηθισμένη ενζυμοπάθεια, ενώ υπολογίζεται ότι την παρουσιάζουν περισσότερα από 400 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως (Mehta et al., 2000; Turan, 2006). Στην Ελλάδα και ειδικά στη Θεσσαλία υπάρχει μεγάλη διάδοση της έλλειψης του G6PD, σε ποσοστό που φτάνει μέχρι το 10% (Missiou-Tsagaraki, 1991).

Όπως προαναφέρθηκε, καθώς το G6PD είναι σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, τα ερυθροκύτταρα ατόμων με έλλειψή του είναι πιο επιρρεπή σε αιμόλυση κάτω από συνθήκες στρες (Kwok et al., 2002; Lim et al., 2005). Δημιουργείται, λοιπόν, η ανάγκη για εύρεση μέσων πρόληψης ή αντιμετώπισης των παθολογικών καταστάσεων που πιθανώς μπορεί να προκύπτουν από την οξειδοαναγωγική ανισορροπία σε αυτή την κατάσταση. Μεταξύ άλλων, εξετάζονται οι πιθανές ευεργετικές επιδράσεις που μπορεί να έχουν διάφορες διατροφικές αντιοξειδωτικές ουσίες.

## **1.2. Αντιοξειδωτική άμυνα και έλλειψη του G6PD**

Οξειδωτικό στρες είναι η κατάσταση κατά την οποία η αντιοξειδωτική άμυνα δεν μπορεί να εξουδετερώσει αποτελεσματικά τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) που παράγονται (Finkel, 2000; Martindale & Holbrook, 2002). Έτσι, οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία που δημιουργείται μεταξύ οξειδωτικών (όπως είναι τα ROS) και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων, μια κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες σε διάφορα βιομόρια (Sies, 1995).

Η αντιοξειδωτική άμυνα χωρίζεται σε ενζυματική και μη ενζυματική. Σημαντικός αντιπρόσωπος της μη ενζυματικής άμυνας είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Βελτίωση των επιπέδων της GSH είναι πιθανό να έχει προστατευτεί δράση στα κύτταρα που είναι ευπαθή στην προσβολή από οξειδωτικούς παράγοντες (Kidd PM, 1997).

Καθώς η αντιοξειδωτική άμυνα των ερυθροκυττάρων εξαρτάται από το G6PD, άτομα με έλλειψη του G6PD παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα GSH. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, το NADPH παράγεται με τη συμμετοχή του G6PD, το οποίο με τη σειρά του δίνει ηλεκτρόνια στη γλουταθειόνη, ώστε να έχει την ανηγμένη της μορφή. Καθώς η GSH ανάγει τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου, προστατεύει την αιμοσφαιρίνη και άλλες ερυθροκυτταρικές πρωτεΐνες από την οξείδωση (Schuurman et al., 2009).

Λόγω της σημασίας της GSH στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, έχει γίνει προσπάθεια να βρεθούν διατροφικές αντιοξειδωτικές ουσίες που θα μπορούσαν προκαλέσουν την αύξησή της. Τέτοιες ουσίες είναι και εκείνες που αποτελούν δότες κυστεΐνης, αφού εφοδιάζουν τον οργανισμό με κυστεΐνη ή πρόδρομα αυτής, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τη σύνθεση της GSH, καθώς στο μόριό της περιέχεται κυστεΐνη (η οποία αποτελεί και το πιο σημαντικό τμήμα αυτής). Για παράδειγμα, έχει μελετηθεί η ουσία α-λιποϊκό οξύ που εμφανίζει θετικές επιδράσεις σε διάφορες νοσογόνες καταστάσεις που σχετίζονται με οξειδοαναγωγική ανισορροπία. Άλλες ουσίες που αποτελούν πρόδρομα της GSH και θεωρούνται γενικά ασφαλή περιλαμβάνουν την Ν-ακετυλ-κυστεΐνη (NAC), καθώς και τα αμινοξέα γλυκίνη, γλουταμίνη, ταυρίνη και μεθειονίνη.

### **1.3. Σημασία της έρευνας**

Η έλλειψη του G6PD προκαλεί οξειδοαναγωγική ανισορροπία (Ho et al., 2007). Το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν αιτιολογικό παράγοντα του παθοφυσιολογικού μηχανισμού δημιουργίας διαφόρων νόσων. Επομένως, η αποκατάσταση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης, ωστόσο δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με την συγκεκριμένη ενζυμοπάθεια. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της συμπληρωματικής χορήγησης α-λιποϊκού οξέος στην αντιοξειδωτική ικανότητα ατόμων με έλλειψη του G6PD, καθώς και την

ανταπόκρισή τους κατά την οξεία άσκηση, η οποία αποτελεί έναν παράγοντα αύξησης της οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας.

#### **1.4. Ερευνητικές υποθέσεις**

- Η συμπληρωματική λήψη α-λιποϊκού οξέος για 4 εβδομάδες θα βελτιώσει την αντιοξειδωτική άμυνα στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD στην ηρεμία.
- Η συμπληρωματική λήψη α-λιποϊκού οξέος για 4 εβδομάδες θα βελτιώσει την απόκριση της αντιοξειδωτικής άμυνας στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD αμέσως μετά και μια ώρα μετά από οξεία άσκηση.

#### **1.5. Στατιστικές υποθέσεις**

##### *Μηδενικές υποθέσεις*

- Μηδενική υπόθεση ( $\mu_1 = \mu_2$ ): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος) στην αντιοξειδωτική άμυνα ατόμων με έλλειψη του G6PD κατά την ηρεμία.
- Μηδενική υπόθεση ( $\mu_1 = \mu_2$ ): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος) στις αποκρίσεις της αντιοξειδωτικής άμυνας ατόμων με έλλειψη του G6PD αμέσως μετά και μια ώρα μετά από οξεία άσκηση.

##### *Εναλλακτικές υποθέσεις*

- Εναλλακτική υπόθεση ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος) στην αντιοξειδωτική άμυνα ατόμων με έλλειψη του G6PD κατά την ηρεμία.

- Εναλλακτική υπόθεση ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος) στις αποκρίσεις της αντιοξειδωτικής άμυνας ατόμων με έλλειψη του G6PD αμέσως μετά και μια ώρα μετά από οξεία άσκηση.

### **1.6. Περιορισμοί της έρευνας**

Περιορισμός της έρευνας θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι επιλέχτηκε η μελέτη συγκεκριμένων δεικτών της αντιοξειδωτικής άμυνας στο αίμα. Επιπλέον, το μικρό δείγμα και η έλλειψη σύγκρισης των αποτελεσμάτων με ομάδα ελέγχου (άτομα με φυσιολογική δραστηριότητα του G6PD).

## **2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ**

### **2.1. Έλλειψη του G6PD και επιδημιολογία αυτής**

Αν και το G6PD απαντάται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, η έλλειψή του αποτελεί σοβαρό ζήτημα κυρίως για τα ερυθροκύτταρα, αν και κάποιος βαθμός έλλειψης μπορεί να υπάρχει και σε κύτταρα άλλων ιστών, όπως του σκελετικού μυός και του ανοσοποιητικού (Luzzatto & Battistuzzi, 1985). Ανάλογα με το γενετικό αίτιο, τα επίπεδα της δραστηριότητας του G6PD μπορεί να διαφέρουν, ενώ σε καμία περίπτωση δεν παρουσιάζεται ολική έλλειψη του ενζύμου, καθώς είναι ασύμβατη με τη ζωή (Beutler, 1994).

Η έλλειψη του G6PD παρουσιάζεται κυρίως στους άνδρες, διότι αποτελεί μια φυλοσύνδετη γενετική διαταραχή (Laosombat et al., 2006; Usanga & Ameen, 2000). Αν και είναι η πιο κοινή ενζυμοπάθεια, η διάδοσή της μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών ποικίλει σημαντικά, αφού σχετίζεται με τη γεωγραφική κατανομή της ελονοσίας. Αυτό σημαίνει ότι τα άτομα που έχουν έλλειψη του G6PD μπορεί να έχουν μερική ανοσία στην ελονοσία (WHO Working Group, 1989). Αυξημένη διάδοση της ενζυμοπάθειας απαντάται σε κυρίως στην Αφρική, στην Ασία, στη Μεσόγειο και στη Μέση Ανατολή. Έτσι, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής εμφανίζεται πιο συχνά σε έγχρωμους άντρες με καταγωγή από τις παραπάνω γεωγραφικές περιοχές (Frank, 2005).

### **2.2. Πιθανές συνέπειες έλλειψης του G6PD**

Ανάλογα με τη γενετική μετάλλαξη, τα επίπεδα της έλλειψης του G6PD μπορεί να διαφέρουν. Γι' αυτό το λόγο έχει γίνει κατηγοριοποίηση των τύπων της έλλειψης του G6PD ανάλογα με το βαθμό έλλειψης και ευπάθειας για εκδήλωση νόσων (Frank, 2005).

Η έλλειψη του G6PD μπορεί να είναι ασυμπτωματική. Ωστόσο, εφόσον ο οργανισμός σε οξειδωτικούς παράγοντες, όπως κατανάλωση κάποιων φαρμάκων και κουκιών, μπορεί να εκδηλωθούν ασθένειες, όπως αιμόλυση (οξεία ή/και χρόνια) (Frank, 2005).

Καθώς το ένζυμο G6PD συμβάλλει στην αντιοξειδωτική άμυνα, η έλλειψή του διαταράσσει την οξειδοαναγωγική ισορροπία. Ωστόσο δεν είναι τεκμηριωμένο εάν συμβάλλει στην εμφάνιση ασθενειών (Ho et al., 2007). Κάποια στοιχεία δείχνουν ότι μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία της κυτταρικής ανάπτυξης και σηματοδότησης, ανώμαλη εμβρυϊκή ανάπτυξη, αυξημένη ευαισθησία σε ιογενείς λοιμώξεις και εκφυλιστικές ασθένειες. Πιο συγκεκριμένα, το G6PD πιθανώς συμβάλλει στην ομαλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος, ενώ η έλλειψή του σχετίζεται με εμφάνιση υπέρταση (Matsui et al., 2005, 2006). Επιπλέον, η έλλειψη του G6PD φαίνεται ότι θα μπορούσε να ενισχύει ιογενείς λοιμώξεις (Ho et al., 2007). Από την άλλη, γίνεται η υπόθεση ότι η έλλειψη του G6PD μπορεί να συμβάλλει στη μειωμένη εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνων εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας πολλαπλασιασμού και της πρόωρης γήρανσης των κυττάρων (Ho et al., 2007).

### **2.3. G6PD και οξειδοαναγωγική κατάσταση**

Τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού έχουν αναπτύξει αποτελεσματική αντιοξειδωτική αμυντική ικανότητα έναντι του οξειδωτικού περιβάλλοντος στο οποίο ζουν. Κύριο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα κύτταρα είναι η παραγωγή των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), όπως σουπεροξειδικά ανιόντα, υδροξυλικές ρίζες και υπεροξείδια του υδρογόνου (Finkel, 2000). Τα ROS μπορεί να προέρχονται είτε από εξωτερική για τα κύτταρα πηγή είτε να αποτελούν παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια.

Όταν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δεν μπορούν να συμβαδίσουν με τον ρυθμό που παράγονται τα ROS, τότε αναπτύσσεται το λεγόμενο οξειδωτικό στρες (Finkel, 2000; Martindale & Holbrook, 2002). Το οξειδωτικό στρες μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε βλάβη των κυττάρων (Sies, 1995).

Αυτή βλάβη παρατηρείται και σε έλλειψη του G6PD (λόγω μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας) και είναι ζήτημα ιδιαίτερης σημασίας για τα ερυθροκύτταρα, όπου μπορεί να επέλθει καταστροφή τους. Όταν το οξειδωτικό στρες αυξάνεται απότομα εξαιτίας κάποιου οξειδωτικού παράγοντα, τότε μπορεί να επέλθει καταστροφή των ερυθροκυττάρων που οδηγεί σε οξεία αιμολυτική αναιμία. Μπορεί όμως το οξειδωτικό στρες να αποτελεί και μια χρόνια κατάσταση για τα ερυθροκύτταρα ατόμων με έλλειψη του G6PD, η οποία αυξάνει την πιθανότητα για κλινική εκδήλωση ήπιας μέχρι σοβαρής χρόνιας αιμόλυσης (Chan et al., 1999). Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στη διαδικασία της γήρανσης και την εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται και με τη γήρανση (Gutteridge & Halliwell, 1994). Διάφορες αιτίες που μπορούν να οδηγήσουν στην αυξημένη παραγωγή ROS, κι επομένως στο οξειδωτικό στρες, όπως είναι η φλεγμονή, ο μεταβολισμός φαρμάκων και η έλλειψη αντιοξειδωτικών βιταμινών.

Η απόκριση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες ποικίλλει (Finkel, 2000; Martindale & Holbrook, 2002). Σημαντικό ρόλο παίζει και η διατροφή, καθώς παρέχει στον οργανισμό αντιοξειδωτικές ουσίες που μπορούν να ενισχύσουν την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα, η οποία χωρίζεται σε ενζυμική και μη ενζυμική. Από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι ιδιαίτερα σημαντικές οι υπεροξειδικές δισμουτάσες, οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης και η καταλάση (Sies, 1995). Από τις μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), το ουρικό οξύ, οι ουμπικινόλες, οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή και το α-λιποϊκό οξύ (Chan et al., 1999). Όσον αφορά άτομα με έλλειψη του



G6PD, έχει φανεί ότι μπορούν να ενισχύσουν την αντιοξειδωτική τους κατάσταση με τη λήψη συνδυασμού των βιταμινών E και C, μειώνοντας έτσι τη σοβαρότητα της αιμολυτικής κρίσης (El-Zoghby et al., 2007).

Λόγω των πιθανών εφαρμογών που μπορούν να έχουν τα διατροφικά αντιοξειδωτικά σε πολλές διαταραχές και νόσους, έχει αυξηθεί πολύ το ενδιαφέρον για αυτά (Simpore et al., 2006; Gigante et al., 2007). Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι η πρόσληψη ορισμένων διατροφικών ουσιών με αντιοξειδωτική δράση (όπως βιταμίνες, μέταλλα και πολυφαινόλες) μπορεί να συμβάλλει τόσο πρόληψη όσο και στην αντιμετώπιση διάφορων νόσων (Wu et al., 2005; Hsia, 2007; Luchsinger et al., 2007; Marcason, 2007).

Όπως προαναφέρθηκε, η GSH αποτελεί μια σημαντική αντιοξειδωτική ουσία του οργανισμού (Chan et al., 1999). Πρόκειται για ένα ένα τριπεπτίδιο (γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη, γλυκίνη) το οποίο εντοπίζεται και στην οξειδωμένη του μορφή, την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Ο λόγος GSSG/GSH θεωρείται ευαίσθητος δείκτης οξειδωτικού στρες (Kidd, 1997), με την ανηγμένη μορφή να κυριαρχεί μέσα στα φυσιολογικά κύτταρα (αποτελεί περίπου το 95% της συνολικής γλουταθειόνης) (Chan et al., 1999).

Η GSH έχει ποικίλους προστατευτικούς ρόλους στα κύτταρα, όπως είναι η προστασία ενάντια σε οξειδωτικές βλάβες, η αποτοξίνωση ιδιαίτερα αντιδραστικών ξеноβιοτικών μεταβολιτών, καθώς και η αναγέννηση αντιοξειδωτικών βιταμινών.

Ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος της GSH είναι η εξουδετέρωση ROS (Meister, 1994). Καθώς η GSH εξουδετερώνει τα ROS, μετατρέπεται σε GSSG σε μια αντίδραση που καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px). Στη συνέχεια, η γλουταθειόνη ανάγεται και μετατρέπεται εκ νέου σε GSH από την αναγωγή της GSSG, προκειμένου να επανέλθει η οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου (Leopold et al., 2001).

## **2.4. Άσκηση και οξειδωτικό στρες**

Η έντονη άσκηση μπορεί να αυξήσει ιδιαίτερα την παραγωγή ROS, σε βαθμό που συχνά υπερβαίνει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών, οδηγώντας έτσι σε οξειδωτικό στρες (Ji, 1999; Radak et al., 2001).

Τα ερυθροκύτταρα είναι ευπαθή σε οξειδωτική βλάβη εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες τους και της υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και αιμοσφαιρίνης (Oztasan et al., 2004). Έτσι, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα όταν υπάρχει έλλειψη του G6PD, καθώς η αντιοξειδωτική άμυνα είναι μειωμένη, λόγω των χαμηλότερων επιπέδων GSH και χαμηλότερης ικανότητας μετατροπής του GSSG σε GSH. Αυτό έχει θεωρητικά ακόμη μεγαλύτερη σημασία όταν δημιουργείται ασκησιογενές οξειδωτικό στρες, αφού θα μπορούσε να προκληθεί οξεία αιμόλυση. Ωστόσο, ελάχιστες μελέτες έχουν διερευνήσει την απόκριση στην άσκηση ατόμων με έλλειψη του G6PD, ώστε να μπορούμε να καταλήξουμε εάν μπορούν να ασκούνται με ασφάλεια.

### **2.4.1. Άσκηση και έλλειψη G6PD**

Όπως προαναφέρθηκε, η έλλειψη του G6PD καθιστά τα κύτταρα ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες κάτω από την επίδραση διαφόρων οξειδωτικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της έντονης άσκησης. Έτσι, θεωρητικά τα άτομα με έλλειψη του G6PD θα πρέπει να αποφεύγουν την έντονη άσκηση, προκειμένου να αποφύγουν τις αρνητικές συνέπειες του αυξημένου οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσει σε αιμολυτική αναιμία και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Σοβαρές παρενέργειες μετά από άσκηση σε άτομα με έλλειψη του G6PD έχουν αναφερθεί σε ελάχιστες περιπτώσεις (Bresolin et al., 1987, 1989, 1992; Ninfali et al., 1991; Kimmick et al., 1996).

Όσον αφορά πειραματικές μελέτες σχετικά με την απόκριση κατά την άσκηση σε άτομα με έλλειψη του G6PD, ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει. Μάλιστα, σε καμία από αυτές δεν έχει

αναφερθεί αυξημένη ευπάθεια για οξειδωτικό στρες ή αιμόλυση μετά από άσκηση σε σχέση με άτομα με φυσιολογική δραστικότητα του G6PD (Jamurtas et al., 2006; Nikolaidis et al., 2006; Theodorou et al., 2010). Συνεπώς, τα μέχρι τώρα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η άσκηση δεν έχει αρνητικές επιδράσεις για τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Περισσότερες μελέτες με διαφορετικές εντάσεις και μορφές άσκησης θα μπορέσουν να δώσουν και περισσότερες πληροφορίες.

## **2.5. Αντιοξειδωτικές ουσίες**

Καθώς φαίνεται ότι η GSH είναι σημαντική για την υγεία των κυττάρων, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εύρεση ασφαλών πρακτικών για την αύξηση της συγκέντρωσής της, κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις όπου υπάρχει οξειδωτικό στρες. Τα άτομα με έλλειψη του G6PD παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα GSH, γεγονός που φανερώνει ότι μια πρακτική αύξησης της GSH θα μπορούσε να οφελήσει και αυτά τα άτομα. Τέτοια πρακτική θα μπορούσε να είναι η διατροφική πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών. Πράγματι, έχει φανεί ότι ουσίες όπως η L-κυστεΐνη (θειούχο αμινοξύ), η N-ακετυλ-κυστεΐνη (παραλλαγή της L-κυστεΐνης), η L-γλουταμίνη (αμινοξύ) είναι πρόδρομα της GSH κι επομένως η διατροφική τους πρόσληψη μπορεί να αυξήσει την παραγωγή αυτής. Η βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ) που έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης μπορεί επίσης να συμμετάσχει στην αναγέννηση της GSH.

### **2.5.1. α-Λιποϊκό οξύ**

Το α-λιποϊκό οξύ είναι μια φυσική διθειολική ένωση με πιθανή χρήση ως φαρμακοθεραπεία ενάντια σε κάποιες νόσους, όπως ο διαβήτης (Petersen Shay et al., 2009). Παράγεται ενδογενώς στα μιτοχόνδρια, αλλά επίσης λαμβάνεται μέσω της

διατροφής (κυρίως εντόσθια, αλλά και πράσινα φυλλώδη λαχανικά, φρούτα) (Packer et al., 2001).

Μέχρι στιγμής δεν έχουν καθοριστεί ανώτατα όρια πρόσληψης για το α-λιποϊκό οξύ, ενώ υπάρχουν μόνο στοιχεία ασφαλούς δόσης σε οξεία στοματική πρόσληψη από διάφορα ζώα. Παρότι είναι μια ουσία με πολλές πιθανές ευεργετικές επιδράσεις, ωστόσο σε κάποιες κλινικές δοκιμές έχει φανεί ότι μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων. Όσον αφορά τη λήψη από το στόμα, 1800 mg α-λιποϊκού οξέος κάθε μέρα για έξι μήνες δεν προκάλεσε σημαντικές αρνητικές επιδράσεις (Ziegler et al., 1999).

Αν και οι ευεργετικές επιδράσεις του α-λιποϊκού οξέος στην υγεία δεν είναι ακόμα ξεκάθαρες, αποτελεί ένα συνηθισμένο συστατικό σε διάφορα συμπληρώματα διατροφής που αφορούν τόσο την υγεία και την γήρανση όσο και την άθληση. Μπορεί να χορηγηθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπου υπάρχει οξειδωτικό στρες όπως διαβήτης, καταρράκτη, HIV, νευροεκφυλισμό, βλάβη από ακτινοβολία και γήρανση (Hagen et al., 1999; Demir et al., 2005; Cui et al., 2006; Kojima et al., 2007; Jariwalla et al., 2008). Επιπλέον, πρόσφατα φάνηκε ότι 4 εβδομάδες συμπληρωματικής λήψης 600 mg α-λιποϊκού οξέος μπορεί να βελτιώσει την αντιοξειδωτική ικανότητα ατόμων με έλλειψη του G6PD.

### 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού (Τ.Ε.Φ.Α.Α.) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Παράρτημα Ι). Στη συνέχεια έγινε καταχώρηση της μελέτης στην ιστοσελίδα <https://clinicaltrials.gov/> με κωδικό NCT02937363 (US National Institutes of Health, 2017).

#### 3.1. Συμμετέχοντες

Ωκτώ άνδρες (ηλικία:  $38,4 \pm 5,6$  ετών) με έλλειψη του ενζύμου G6PD συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη. Αρχικά, όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για το περιεχόμενο της μελέτης, τα προσκοδώμενα οφέλη και τους κινδύνους από τη συμμετοχή τους στις πειραματικές διαδικασίες. Στη συνέχεια υπέγραψαν ένα έντυπο συναίνεσης (Παράρτημα ΙΙ). Επίσης, συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο υγείας (Παράρτημα ΙΙΙ)

Δόθηκαν οδηγίες σε όλους τους συμμετέχοντες να μην συμμετέχουν σε υψηλής έντασης φυσική δραστηριότητα τις 2 ημέρες πριν από κάθε επίσκεψη στο εργαστήριο για μετρήσεις. Επιπλέον, τους ζητήθηκε να μην αλλάξουν τον τρόπο ζωής τους όσον αφορά τη φυσική δραστηριότητα και τις διατροφικές συνήθειες.

Λόγοι αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν η λήψη φαρμακευτικής αγωγής που επηρεάζει τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού, καθώς αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής μέσα στο τελευταίο εξάμηνο. Επίσης, λόγοι αποκλεισμού αποτέλεσαν σοβαρά προβλήματα υγείας κατά το παρελθόν, τα οποία δεν θα επέτρεπαν τη συμμετοχή σε κάποιες από τις αξιολογήσεις, καθώς και προβλήματα στο ήπαρ και στο γαστρικό σωλήνα.

### 3.2. Πειραματική διαδικασία

Οι συμμετέχοντες έλαβαν συμπλήρωμα α-λιποϊκού οξέος (600 mg/ημέρα; Myprotein, Cheshire, UK) για 4 εβδομάδες και εικονικό σκεύασμα για άλλες 4 εβδομάδες, με μια περίοδο έκπλυσης 4 εβδομάδων μεταξύ της λήψης συμπληρώματος και εικονικού σκευάσματος.

Δόθηκαν οδηγίες στους συμμετέχοντες να καταγράψουν τη διατροφή τους για δυο ημέρες πριν την πρώτη επίσκεψη για μετρήσεις. Επιπλέον, αυτή τη διατροφή έπρεπε να την ακολουθήσουν πάλι πριν από κάθε επόμενη επίσκεψη.

Οι μετρήσεις έγιναν με τους συμμετέχοντες νηστικούς από το προηγούμενο βράδυ, ενώ επίσης απείχαν από την κατανάλωση αλκοόλ και καφεΐνης όλη την προηγούμενη ημέρα.

Οι διάφορες αξιολογήσεις έγιναν πριν και αμέσως μετά το τέλος της λήψης συμπληρώματος και εικονικού σκευάσματος (συνολικά τέσσερις επισκέψεις στο εργαστήριο). Επιπρόσθετα, στην αρχή έγινε και αξιολόγηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO<sub>2</sub>max).

Σε κάθε επίσκεψη στο εργαστήριο (πριν και αμέσως μετά το τέλος της λήψης συμπληρώματος και εικονικού σκευάσματος) έγιναν οι εξής αξιολογήσεις:

- Σωματομετρικά χαρακτηριστικά (βάρος, δείκτης μάζας σώματος, περίμετρος μέσης, περίμετρος ισχίου, λόγος περιμέτρων μέσης/ισχίου, λίπος σώματος)
- Δοκιμασία άσκησης μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο
- Αιμοληψίες πριν, αμέσως μετά και μια ώρα μετά τη δοκιμασία άσκησης για μετέπειτα προσδιορισμό αντιοξειδωτικών δεικτών.

Όλες οι μετρήσεις έγιναν πρωινές ώρες, σε χώρο με ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (20-22°C, 45-50% υγρασία).

### **3.3. Σωματομετρικές αξιολογήσεις**

Έγινε μέτρηση του σωματικού ύψους (με προσέγγιση 1 mm) και σωματικού βάρους (με προσέγγιση 100 g) με μηχανικό ζυγό (Beam Balance, Seca, UK), με τους συμμετέχοντες ελαφρά ντυμένους και ξυπόλυτους, πρωινές ώρες. Έπειτα υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) με την εξίσωση:  $\Delta\text{Μ}\Sigma = \text{Βάρος} / \text{Υψος}^2$ .

Η σωματική σύσταση (σωματικού λίπους και άλιπης μάζας) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της απορροφησιομετρίας ακτίνων Χ διπλής ενέργειας (dual-energy X-ray absorptiometry – DEXA) (Lunar DPX NT, GE Healthcare, UK).

### **3.4. Φυσική δραστηριότητα**

Το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας προσδιορίστηκε με συμπλήρωση από τους συμμετέχοντες του διεθνούς ερωτηματολογίου επιπέδου φυσικής δραστηριότητας (IPAQ; Papathanasiou et al., 2009).

### **3.5. Προσδιορισμός μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου**

Όλοι οι συμμετέχοντες εκτέλεσαν μια δοκιμασία για τον προσδιορισμό της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου τους ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) σε δαπεδοεργόμετρο. Συνοπτικά, έγινε προθέρμανση και εκπαίδευση του συμμετέχοντα, ώστε να μπορεί να κινείται και να κατεβαίνει από το δαπεδοεργόμετρο με ασφάλεια, και στη συνέχεια έγινε σύνδεση με τη μάσκα του αναλυτή (για καταγραφή της ανταλλαγής αερίων) και καρδιοσυχνόμετρο (Polar RC3 GPS HR; Polar Electro Oy, Kempele, Finland). Τα πρώτα δυο λεπτά της άσκησης ο συμμετέχοντας έκανε άσκηση περίπου στο 60% της  $\text{VO}_{2\text{max}}$  με σταθερή ταχύτητα, ενώ στη συνέχεια αυξανόταν κατά 0,5 χιλιόμετρα/ώρα (km/h) κάθε ένα λεπτό.

### 3.6. Αξιολόγηση απόδοσης κατά την άσκηση

Οι συμμετέχοντες έλαβαν μέρος σε δοκιμασία σε δαπαδοεργόμετρο και αξιολογήθηκε ο χρόνος μέχρι την εξάντληση ως δείκτης της αερόβιας αντοχής. Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο της δοκιμασίας ήταν το εξής: οι συμμετέχοντες έκαναν τρέξιμο έντασης περίπου 70-75% της  $VO_{2max}$  για 45 λεπτά. Έπειτα, η ταχύτητα αυξήθηκε ώστε να αντιστοιχεί στο 90% της  $VO_{2max}$  τους μέχρι εξάντλησης. Η καρδιακή συχνότητα ελεγχόταν με καρδιοσυχνόμετρο (Polar RC3 GPS HR; Polar Electro Oy, Kempele, Finland), η ανταλλαγή αερίων μέσω σταθερού αναλυτή αερίων και η αντιλαμβανόμενη αίσθηση κόπωσης με την κλίμακα Borg κάθε πέντε λεπτά.

### 3.7. Συλλογή και χειρισμός αίματος

Οι αιμοληψίες έγιναν από τη βασιλική ή μεσοβασιλική ή κεφαλική φλέβα των άνω άκρων με τη χρήση βελόνας από εκπαιδευμένο άτομο που τήρησε όλους τους προβλεπόμενους κανόνες ασηψίας και αντισηψίας, με τους συμμετέχοντες σε ύπτια θέση.

- Μια αρχική αιμοληψία έγινε για προσδιορισμό της δραστηριότητας του G6PD στα ερυθροκύτταρα. Μια μικρή ποσότητα αίματος συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε φυαλίδιο με EDTA, το οποίο ανακινήθηκε. Ο προσδιορισμός έγινε μέσα σε μια ώρα από την αιμοληψία.

- Οι υπόλοιπες αιμοληψίες έγιναν πριν, αμέσως μετά και μια ώρα μετά από κάθε δοκιμασία απόδοσης. Το αίμα τοποθετήθηκε σε σωληνάρια διαχωρισμού ορού που περιείχαν ενεργοποιητή της πήξης. Μετά από 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε φυγοκέντρηση του αίματος στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C για το διαχωρισμό και τη λήψη του υπερκείμενου (ορού). Αμέσως μετά ο ορός τοποθετήθηκε σε φυαλίδια Eppendorf™ και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για τον μετέπειτα



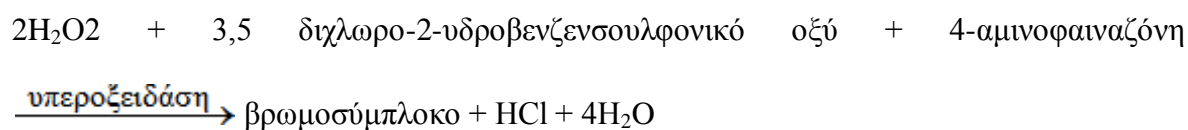
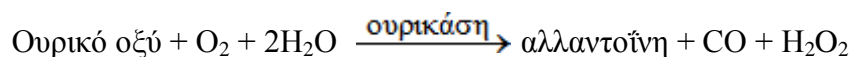
προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), του ουρικού οξέος και της ολικής χολερυθρίνης.

### **3.8. Αναλύσεις μεταβολικών δεικτών**

*Προσδιορισμός δραστηριότητας του G6PD.* Έγινε ποσοτικός, υπεριώδης, κινητικός προσδιορισμός του G6PDH σε ολικό αίμα. Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της εταιρίας Trinity Biotech Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (Trinity Biotech, Jamestown, NY). Η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 340nm έγινε με το φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1900 (Hitachi, Tokyo, Japan). Επιπλέον, προκειμένου να εκφραστεί η δραστηριότητα του G6PD ως U/g αιμοσφαιρίνης (Hb), μετρήθηκε και η Hb στο αίμα. Έτσι, μια ποσότητα από το αίμα που τοποθετήθηκε στο φυαλίδιο με το EDTA χρησιμοποιήθηκε για γενική εξέταση αίματος σε αυτόματο αναλυτή (Mythic 18 Orphée, Orphée Medical, Geneva, Switzerland). Η κάθε εξέταση έγινε εις διπλούν και λήφθηκε ο μέσος όρος. Οι φυσιολογικές τιμές για τη συγκεκριμένη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε είναι μεταξύ 4.5-13.5 U/g Hb.

*Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).* Ο προσδιορισμός της TAC βασίζεται στην εξουδετέρωση της ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλη (DPPH), σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Janaszewska και Bartosz (2002). Συνοπτικά, 20  $\mu$ l δείγματος ορού προστέθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf™ με 480  $\mu$ l φωσφορικού νατρίου-καλίου (pH 7.4) και 500  $\mu$ l διαλύματος DPPH 0.1 mM. Έγινε ανάδευση και τα δείγματα έμειναν στο σκοτάδι σε ηρεμία για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα έγινε φυγοκέντριση για 3 λεπτά στα 20000g. Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε κυβέτες και μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 520 nm.

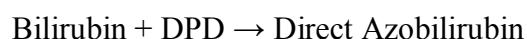
*Προσδιορισμός ουρικού οξέος.* Έγινε προσδιορισμός του ουρικού οξέος με τη μέθοδο PAP, με τη βοήθεια της ενζυματικής αντίδρασης με ουρικάση. Το παραγόμενο υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά με το υδροξυ-βενζοσουλφονικό οξύ και την 4-αμινοφαιναζόνη (οξειδωση χρωμογόνου), κάτω από την καταλυτική παρουσία της υπεροξειδάσης, δίνοντας μια κοκκινοβιολετί κυννεϊμίνη. Οι αντιδράσεις είναι οι εξής:



Για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέυ χρησιμοποιήθηκε βιοχημικός αναλυτής (Clinical Chemistry Analyzer Z 1145 – Zafiropoulos Diagnostica) και αντιδραστήρια της εταιρείας Ζαφειρόπουλος (Αθήνα, Ελλάδα).

*Προσδιορισμός ολικής χολερυθρίνης.* Η χολερυθρίνη αντιδρά με DPD σχηματίζοντας Azobilirubin. Η απορρόφηση της Azobilirubin είναι απ'ευθείας ανάλογη με την συγκέντρωση χολερυθρίνης στο δείγμα σε μήκος κύματος 546 nm.

Ολική χολερυθρίνη = Άμεση + Έμμεση χολερυθρίνη



Για τον προσδιορισμό της ολικής χολερυθρίνης χρησιμοποιήθηκε βιοχημικός αναλυτής (Clinical Chemistry Analyzer Z 1145 – Zafiropoulos Diagnostica) και αντιδραστήρια της εταιρείας Ζαφειρόπουλος (Αθήνα, Ελλάδα).

### 3.9. Στατιστική ανάλυση

Έγινε ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο (repeated measures ANOVA) προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές μεταξύ

των δύο σκευασμάτων (α-λιποϊκό οξύ και εικονικό σκεύασμα) πριν και αμέσως μετά από τη λήψη του καθενός. Η παρουσίαση των δεδομένων είναι ως μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το  $p=0.05$ . Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοση 18.0 (SPSS Inc., USA).

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μέση δραστικότητα του G6PD ήταν  $0.502 \pm 0.01$  U/g Hb. Όσον αφορά τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά, δεν υπήρξε σημαντική αλλαγή σε καμία εξεταζόμενη παράμετρο (Πίνακας 1).

Δεν φάνηκε να μεταβάλλεται το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και η αρτηριακή πίεση μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος. Η καρδιακή συχνότητα ηρεμίας ωστόσο μειώθηκε σημαντικά μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος. Όσον αφορά την απόδοση κατά την άσκηση, δεν παρουσιάστηκε διαφορά στο χρόνο μέχρι την εξάντληση μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος (Πίνακας 2).

**Πίνακας 1.** Σωματομετρικά χαρακτηριστικά πριν και μετά τη λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.

	α-Λιποϊκό οξύ		Εικονικό σκευάσμα	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
<b>Βάρος (kg)</b>	81.64 $\pm$ 5.65	81.67 $\pm$ 5.32	81.53 $\pm$ 5.96	82.00 $\pm$ 5.86
<b><math>\Delta</math>ΜΣ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25.99 $\pm$ 1.50	26.02 $\pm$ 1.40	25.94 $\pm$ 1.58	26.09 $\pm$ 1.53
<b>% Λίπος</b>	25.84 $\pm$ 2.16	25.36 $\pm$ 2.32	25.43 $\pm$ 2.18	26.37 $\pm$ 1.92
<b>Περίμετρος μέσης (cm)</b>	89.36 $\pm$ 8.37	89.14 $\pm$ 9.00	88.57 $\pm$ 8.78	88.64 $\pm$ 8.00
<b>Περίμετρος ισχίου (cm)</b>	104.7 $\pm$ 6.7	104.1 $\pm$ 6.7	104.6 $\pm$ 6.4	104.3 $\pm$ 6.4
<b>WHR</b>	0.853 $\pm$ 0.017	0.855 $\pm$ 0.018	0.846 $\pm$ 0.016	0.849 $\pm$ 0.014

*$\Delta$ ΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος. WHR: Λόγος περιμέτρου μέσης προς περίμετρο ισχίου.*

**Πίνακας 2.** Φυσιολογικές παράμετροι και απόδοση κατά την άσκηση πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.

	α-Λιποϊκό οξύ		Εικονικό σκεύασμα	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
<b>IPAQ (MET-min/week)</b>	1226±336	1199±281	922±323	981±336
<b>ΚΣΗ</b>	63.43±2.57	59.29±1.91*	62.14±2.53	62.00±2.73
<b>Συστολική πίεση (mm Hg)</b>	130.9±11.7	130.0±12.7	130.6±11.1	129.1±12.0
<b>Διαστολική πίεση (mm Hg)</b>	82.0±7.4	80.0±5.9	81.7±6.5	78.6±4.4
<b>Χρόνος μέχρι την εξάντληση (s)</b>	198.9±37.0	246.9±37.6	207.9±37.4	267.4±36.4

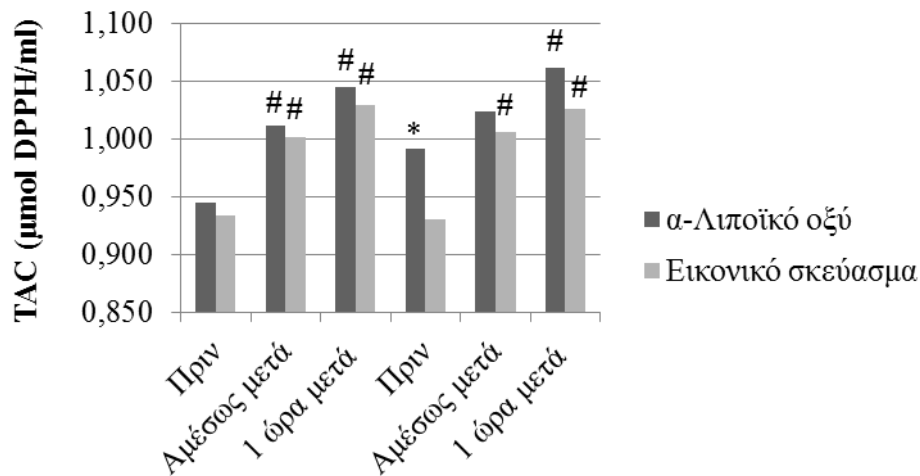
\*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με πριν τη λήψη λιποϊκού οξέος. *IPAQ*:

*International Physical Activity Questionnaire*; *MET*: *Metabolic Equivalent of Task*; *ΚΣΗ*:

*Καρδιακή Συχνότητα Ηρεμίας*.

Όσον αφορά τους μεταβολικούς δείκτες, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 1-3). Μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος, υπήρξε σημαντική αύξηση της TAC και της χολερυθρίνης στην ηρεμία. Ως απόκριση στην άσκηση, η TAC αυξήθηκε πριν και μετά τη λήψη και των δυο σκευασμάτων, ενώ η χολερυθρίνη μόνο μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος. Επιπλέον, μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος υπήρξε μια μη στατιστικά σημαντική ( $p=0.06$ ) αύξηση του ουρικού οξέος αμέσως μετά την άσκηση.

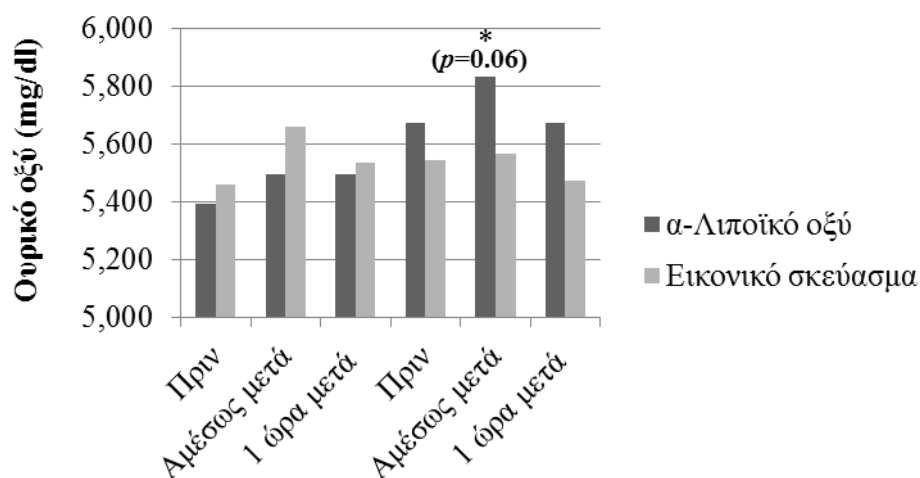
**Σχήμα 1.** Απόκριση κατά την άσκηση της TAC στον ορό πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.



\*Σημαντική διαφορά στο ίδιο χρονικό σημείο άσκησης (πριν, αμέσως μετά, 1 ώρα μετά) σε σχέση με πριν τη λήψη του συγκεκριμένου σκευάσματος.

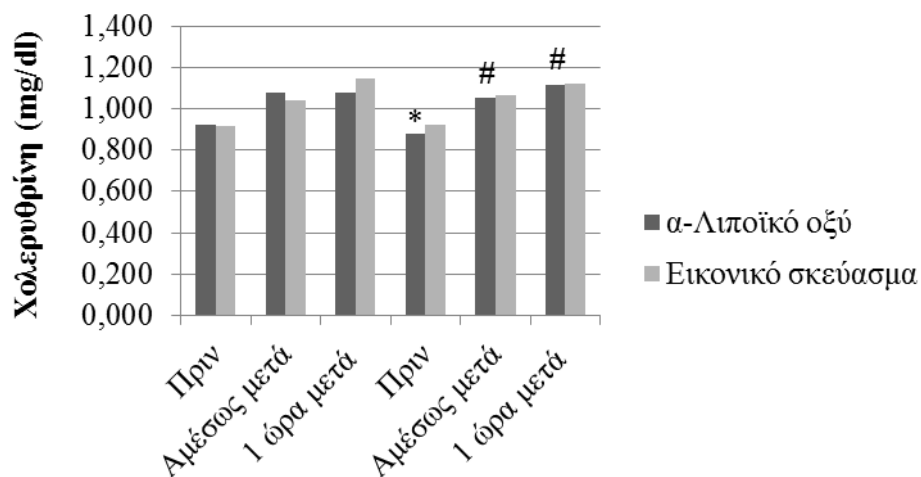
<sup>#</sup>Σημαντική διαφορά σε σχέση με πριν την άσκηση στο ίδιο σημείο λήψης του σκευάσματος (πριν, μετά).

**Σχήμα 2.** Απόκριση κατά την άσκηση του ουρικού οξέος ορού πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.



\*Μη στατιστικά σημαντική διαφορά στο ίδιο χρονικό σημείο άσκησης (πριν, αμέσως μετά, 1 ώρα μετά) σε σχέση με πριν τη λήψη του συγκεκριμένου σκευάσματος.

**Σχήμα 3.** Απόκριση κατά την άσκηση της χολερυθρίνης ορού πριν και μετά από λήψη συμπληρώματος α-λιποϊκού οξέος και εικονικού σκευάσματος.



\*Σημαντική διαφορά στο ίδιο χρονικό σημείο άσκησης (πριν, αμέσως μετά, 1 ώρα μετά) σε σχέση με πριν τη λήψη του συγκεκριμένου σκευάσματος.

#Σημαντική διαφορά σε σχέση με πριν την άσκηση στο ίδιο σημείο λήψης του σκευάσματος (πριν, μετά).

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της συμπληρωματικής λήψης α-λιποϊκού οξέος σε μεταβολικούς δείκτες σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συμπληρωματική λήψη α-λιποϊκού οξέος για 4 εβδομάδες μπορεί να συμβάλλει στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας, τόσο στην ηρεμία όσο και ως απόκριση κατά την άσκηση.

Η TAC, όπως φανερώνει και το όνομά της, αποτελεί ένα δείκτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού. Η συμπληρωματική λήψη α-λιποϊκού οξέος οδήγησε σε σημαντική αύξηση της TAC στην ηρεμία. Προηγούμενη μελέτη με ίδιας διάρκειας και ποσότητας λήψη α-λιποϊκού οξέος είχε παρόμοιο αποτέλεσμα, τόσο σε άτομα με έλλειψη όσο και σε άτομα με φυσιολογική δραστηριότητα του G6PD (Georgakouli et al., 2013). Επιπλέον, η TAC αυξήθηκε πριν και μετά τη λήψη και των δυο σκευασμάτων (α-λιποϊκό οξύ και εικονικό σκεύασμα) μετά την άσκηση. Η αύξηση των επιπέδων της TAC ως απόκριση στην άσκηση υποδηλώνει ότι η οξεία άσκηση ενεργοποιεί τις αντιοξειδωτικές άμυνες του σώματος. Έτσι, φαίνεται ότι οι αντιοξειδωτικές άμυνες του αίματος σε αυτά τα άτομα μπορεί να μην διαφέρουν με αυτές σε φυσιολογικά άτομα (Nikolaidis, 2006), ωστόσο το α-λιποϊκό οξύ μπορεί να τις ενισχύσει περαιτέρω.

Το ουρικό οξύ αποτελεί σημαντικό μέρος της TAC (Balakrishnan and Anuradha, 1998). Ωστόσο, δεν υπήρξε παρόμοια μεταβολή τόσο στην ηρεμία όσο και ως απόκριση στην άσκηση, παρά μόνο μια μη στατιστικά σημαντική ( $p=0.06$ ) αύξηση αμέσως μετά την άσκηση, μόνο μετά τη λήψη του α-λιποϊκού οξέος. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η λήψη α-λιποϊκού οξέος οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ουρικού οξέος σε άτομα με έλλειψη του G6PD, αλλά όχι σε άτομα με φυσιολογική δραστηριότητα του ενζύμου (Georgakouli et al., 2013). Το ουρικό οξύ είναι πιθανό να επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες πέρα



από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού, με αποτέλεσμα να την μπορεί να δωθεί μια πιο ξεκάθαρη απάντηση στα αποτελέσματα.

Επιπρόσθετα, μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος υπήρξε σημαντική αύξηση της χολερυθρίνης στην ηρεμία, αλλά και ως απόκριση στην άσκηση (αμέσως μετά και 1 ώρα μετά), κάτι που δεν παρατηρήθηκε με το εικονικό σκεύασμα. Η χολερυθρίνη αποτελεί μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας, όμως είναι και ένας δείκτης καταστροφής των ερυθροκυττάρων. Υπάρχει η υπόθεση ότι τα άτομα με έλλειψη του G6PD μπορεί να είναι πιο επηρρεπή στην αιμόλυση μετά από οξεία άσκηση, ωστόσο η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν σε φυσιολογικά πλαίσια, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην αντιοξειδωτική δράση της χολερυθρίνης.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπόψη, φαίνεται ότι το α-λιποϊκό οξύ μπορεί να συμβάλλει στην αντιοξειδωτική άμυνα ατόμων με έλλειψη του G6PD και να την ενισχύσει ώστε να προστατεύονται καλύτερα και όταν ασκούνται. Περισσότερη χρονική διάρκεια χορήγησης της ουσίας θα μπορούσε να έχει ακόμα πιο εμφανή αποτελέσματα.

Επιπλέον, εξέταση περισσότερων δεικτών της οξειδοαναγωγικής κατάστασης θα έδιναν μια πιο ξεκάθαρη εικόνα. Ακόμα, εξέταση της επίδρασης του φύλου, καθώς και του τύπου της έλλειψης του G6PD (δηλαδή ανάλογα με το επίπεδο δραστηριότητας του ενζύμου) θα μπορούσαν να δώσουν επιπλέον πληροφορίες.

Τέλος, διαφορετικά πρωτόκολλα άσκησης, όπου τα επίπεδα οξειδωτικού στρες και φλεγμονής διαφέρουν, θα μπορούσαν να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την απόκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD μετά τη λήψη α-λιποϊκού οξέος και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε θέσπιση οδηγιών για ασφαλή άσκηση σε αυτά τα άτομα.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Balakrishnan, S. D. & C. V. Anuradha. (1998). Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. *Cell Biochem. Funct.* 16, 269–275.

Beutler, E. (1988). The relationship of red cell enzymes to red cell life-span. *Blood Cells*, 14, 69-91.

Beutler, E. (1994). G6PD deficiency. *Blood*, 84, 3613-36.

Bresolin, N., Bet, L., Moggio, M., Meola, G., Comi, G., Gilardi, A., et al., (1987). Muscle G6PD deficiency. *Lancet*, 330, 212-3.

Bresolin, N., Bet, L., Moggio, M., Meola, G., Fortunato, F., Comi, G., Adobbati, L., Geremia, L., Pittalis, S., Scarlato, G. (1989). Muscle glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Neurol*, 236, 193-8.

Bresolin, N., Comi, P. G., Ninfali, P., Meola, G., Gallanti, A., Ravasio, A., et al. (1992). Muscular G6PD deficiency: a definite clinical syndrome? *Clin Neuropathol*, 11, 89.

Chan, A.C., Chow, C.K. & Chiu, D. (1999). Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *P.S.E.B.M.*, 222, 274-282.

Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J., Packer, L. & Liu, J. (2006). Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative

damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J. Neurosci. Res.*, 83, 1584–1590.

Demir, U., Demir, T. & Ilhan, N. (2005). The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica*, 219, 49–53.

El-Zoghby, S.M., Helmy, M.H., Ghanem, A.M., Hanafi, M.Y., El-Nabi Kamela, M.A., El-Sayed, A.A. (2007). The status of antioxidant defences in g-6-pd deficient patients. The role of antioxidants to ameliorate hemolytic crisis. *The Egyptian Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 25 (2), 114-133.

Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.*, 476, 52–54

Frank, J.E. (2005). Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *Am Fam Physician*, 72, 1277-82.

Gaetani, G.F., Rolfo, M., Arena, S., Mangerini, R., Meloni, G.F., Ferraris, A.M. (1996). Active Involvement of Catalase During Hemolytic Crises of Favism. *Blood*, 88(3), 1084-8.

Georgakouli, K., Deli, C.K., Zalavras, A., Fatouros, I.G., Kouretas, D., Koutedakis, Y., Jamurtas, A.Z. (2013). A-lipoic acid supplementation up-regulates antioxidant capacity in adults with G6PD deficiency. *Food Chem Toxicol*, 61, 69-73.

Gigante, D.P., Buchweitz, M., Helbig, E., Almeida, A.S., Araujo, C.L., Neumann, N.A., Victora, C. (2007). Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschools. *J Pediatr*, 83, 363–9.

Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. New York. *Oxford University Press*, 111-123.

Hagen, T.M., Ingersoll, R.T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C.M., Vinarsky, V., Bartholomew, J.C., Ames, A.B. (1999). R-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J*, 13, 411–418.

Ho, H.Y., Cheng, M.L., Chiu, D.T. (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase – from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Report*, 12(3), 109-118.

Jamurtas, A.Z., Fatouros, I.G., Koukostas, N., Manthou, E., Tofas, T., Yfanti, C., Nikolaidis, M.G., Koutedakis, Y. (2006). Effect of exercise on oxidative stress in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *In Vivo*, 20(6B), 875-80.

Janaszewska, A., Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 62, 231–236.

- Jariwalla, R.J., Lalezari, J., Cenko, D., Mansour, S.E., Kumar, A., Gangapurkar, B., Nakamura, D. (2008). Restoration of blood total glutathione status and lymphocyte function following alpha-lipoic acid supplementation in patients with HIV infection. *J. Altern. Complement. Med.*, 14, 139–146.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 283–292.
- Kidd, P.M. (1997). Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev*, 2(3):155-176.
- Kimmick, G. & Owen J. (1996). Rhabdomyolysis and hemolysis associated with sickle cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *South Med J*, 89(11), 1097-8.
- Kojima, M., Sun, L., Hata, I., Sakamoto, Y., Sasaki, H., Sasaki, K., 2007. Efficacy of alpha lipoic acid against diabetic cataract in rat. *Jpn. J. Ophthalmol*, 51, 10–13.
- Kwok, C.J., Martin, A.C., Au, S.W., Lam, V.M. (2002). G6PDdb, an integrated database of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations. *Hum Mutat*, 19(3), 217-24.
- Laosombat, V., Sattayasevana, B., Chotsampancharoen, T., Wongchanchailert, M. (2006). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variants Associated with Favism in Thai Children. *Int J Hematol*, 83(2), 139-43.

Leopold, J.A., Cap, A., Scribner, A.W., Stanton, R.C. & Loscalzo, J. (2001). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J*, 15(10), 17771-3.

Lim, F., Vulliamy, T. & Abdalla, S.H. (2005). An Ashkenazi Jewish woman presenting with favism. *J Clin Pathol*, 58(3), 317-9.

Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Miller, J., Green, R. & Mayeux, R. (2007). Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly. *Arch Neurol*, 64, 86–92.

Luzzatto, L. & Battistuzzi, G. (1985). Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Adv Hum Genet*, 14, 217-329.

Marcason, W. (2007). Is supplementation of B vitamins still recommended to reduce the risk of heart disease? *J Am Diet Assoc*, 107, 525–31.

Marks, P.A., Johnson, A.B. (1958). Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *J Clin Invest*, 37, 1542-1548.

Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.*, 192, 1–15

Matsui, R., Xu, S., Maitland, K.A. et al. (2005). Glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency decreases the vascular response to angiotensin II. *Circulation*, 112, 257–263.

Matsui, R., Xu, S., Maitland, K.A. et al. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases vascular superoxide and atherosclerotic lesions in apolipoprotein E(–/–) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 910–916.

Mehta, A., Mason, P.J., Vulliamy, T.J. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13(1), 21-38.

Meister, A. (1994). Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res*, 54(7 Suppl), 1969-1975.

Missiou-Tsagaraki, S. (1991). Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: prevalence among 1,286,000 Greek newborn infants. *J Pediatr*, 119(2), 293-299.

Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Paschalis, V., Kostaropoulos, I.A., Kladi-Skandali, A., Balamitsi, V., Koutedakis, Y., Kouretas, D. (2006). Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc*, 38(8), 1443-50.

Ninfali, P., Bresolin, N., Baronciani, L., Fortunato, F., Comi, G., Magnani, M., et al., (1991) Glucose-6-phosphate dehydrogenase Lodi 844 C: A study on its expression in blood cells and muscle. *Enzyme*, 45, 180-7.



Oztasan, N., Taysi, S., Gumustekin, K., Altinkayak, K., Aktas, O., Timur, H., et al. (2004). Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 91, 622–627.

Packer, L., Kraemer, K. & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17, 888–895.

Papathanasiou, G., Georgoudis, G., Papandreou, M., Spyropoulos, P. Georgakopoulos, D., Kalfakakou, V. et al. (2009). Reliability measures of the short International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in Greek young adults, *Hellenic J. Cardiol.*, 50(4), 283-294.

Petersen Shay, K., Moreau, R.F., Smith, E.J., Smith, A.R. & Hagen, T.M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement. Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(10), 1149–1160.

Piomelli, S., Corash, L.M., Davenport, D.D., et al. (1968). In vivo lability of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Gd A and Gd Mediterranean deficiency. *J Clin Invest*, 47, 940-948.

Radak, Z., Taylor, A. W., Ohno, H. & Goto, S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc. Immun. Rev.*, 7, 90 –107.

Schuurman, M., Waardenburg, D., Costa, J.D., Niemarkt, H. & Leroy, P. (2009). Severe hemolysis and methemoglobinemia following fava beans ingestion in glucose-6-

phosphatase dehydrogenase deficiency: case report and literature review. *European Journal of Pediatrics*, 168(7), 779-782.

Sies, H. (1995). Strategies of antioxidant defense: Relations to oxidative stress. In: Signaling mechanisms - from transcription factors to oxidative stress, ed. Packer, L., Wirtz, K. *NATO ASI Series*, Berlin Heidelberg Springer-Verlag, 92, 165-186.

Simpore, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere, A., Pignatelli, S., et al. (2006). Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutr J*, 5, 3-7.

Theodorou, A.A., Nikolaidis, M.G., Paschalis, V., Sakellariou, G.K., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Jamurtas, A.Z. (2010). Comparison between glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient and normal individuals after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 42(6), 1113-21.

Turan, Y. (2006). Prevalence of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the population of western Turkey. *Arch Med Res*, 37(7), 880-2.

Usanga, E.A. & Ameen, R. (2000). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Kuwait, Syria, Egypt, Iran, Jordan and Lebanon. *Hum Hered*, 50(3), 158-61.

US National Institutes of Health, ClinicalTrials.gov., <http://www.clinicaltrials.gov>; 2017 (προσπελάστηκε στις 10/10/2017).

WHO Working Group. (1989). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*, 67, 601-611.

Wu, L.C., Ho, J.A., Shieh, M.C., Lu, I.W. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. *J Agric Food Chem*, 53, 4207–12.

Ziegler, D., Hanefeld, M., Ruhnau, K.J., Hasche, H., Lobisch, M., Schutte, K., Kerum, G. & Malessa, R. (1999). Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III study). ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*, 22, 1296–1301.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



### Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας

Τρίκαλα: 10/02/2016  
Αριθμ. Πρωτ.: 1076

**Βεβαίωση έγκρισης της πρότασης για διεξαγωγή Έρευνας με τίτλο:**

Διερεύνηση και σύγκριση των προκαλούμενων με την οξεία άσκηση αλλαγών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) μετά τη συμπληρωματική λήψη λιπτοϊκού οξέος και N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC)

**Επιστημονικός υπεύθυνος – επιβλέπων:** Τζιαμούρτας Αθανάσιος

**Κύρια ερευνήτρια – φοιτήτρια:** Γεωργακούλη Καλλιόπη

**Ίδρυμα & Τμήμα:** 1) Τμήμα Επιστήμης Φυσικής αγωγής και Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Η προτεινόμενη έρευνα θα είναι:**

Ερευνητικό πρόγραμμα ☐ Μεταπτυχιακή διατριβή ☐ Διπλωματική εργασία ☐ Ανεξάρτητη έρευνα ☒

**Τηλ. επικοινωνίας:** 6977989041

**Email επικοινωνίας:** ajamurt@pe.uth.gr

Η Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας του Τ.Ε.Φ.Α.Α., Πανεπιστημίου Θεσσαλίας μετά την υπ. Αριθμ. 3-2/10-2-2016 συνεδρίασή της εγκρίνει τη διεξαγωγή της προτεινόμενης έρευνας.

Ο Πρόεδρος της  
Εσωτερικής Επιτροπής  
Δεοντολογίας – ΤΕΦΑΑ

Τσιόκανος Αθανάσιος  
Αναπληρωτής Καθηγητής

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

### Έντυπο συναίνεσης δοκιμαζόμενου σε ερευνητική εργασία

**Επιστημονικός υπεύθυνος – επιβλέπων:** Τζιαμούρτας Αθανάσιος

**Τίτλος Μελέτης:** Διερεύνηση και σύγκριση των προκαλούμενων με την οξεία άσκηση αλλαγών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) μετά τη συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος και N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC)

**Εργαστήριο υλοποίησης της μελέτης:** Κέντρο Έρευνας και αξιολόγησης της Απόδοσης, ΤΕΦΑΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Σκοπός της ερευνητικής εργασίας**

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να διερευνηθούν και να συγκριθούν οι προκαλούμενες με την οξεία άσκηση αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD μετά τη συμπληρωματική λήψη λιποϊκού οξέος και NAC. Επίσης να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ της συμπληρωματικής λήψης λιποϊκού οξέος, NAC και εικονικού συμπληρώματος.

Τα επίπεδα της γλουταθειόνης (ενδογενής αντιοξειδωτική ουσία) είναι πολύ χαμηλότερα σε αυτά τα άτομα σε σχέση με άτομα με φυσιολογικές τιμές δραστηριότητας του ενζύμου. Επομένως, υποθέτουμε ότι η συμπληρωματική λήψη ουσιών που αυξάνουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (όπως είναι το λιποϊκό οξύ και η NAC) θα βελτιώσουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση σε αυτά τα άτομα, επιφέροντας θετικές συνέπειες σε δείκτες υγείας αλλά και στην απόδοση.

#### **Διαδικασία μετρήσεων**

Οι συμμετέχοντες θα επισκεφτούν το εργαστήριο πέντε φορές. Στην 1η επίσκεψη θα υπογραφεί η συναίνεση αφού γίνει ενημέρωση για τη διαδικασία, θα γίνουν οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος, ποσοστό λίπους) και φυσιολογικές μετρήσεις (καρδιακή συχνότητα ηρεμίας, αρτηριακή πίεση), καθώς και η δοκιμασία για προσδιορισμό της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO2max) σε δαπεδοεργόμετρο.

Επίσης θα δοθούν στους συμμετέχοντες πλήρεις οδηγίες για τον τρόπο καταγραφής της διατροφής τους, ώστε να καταγράψουν αναλυτικά τι έφαγαν τις 2 ημέρες που θα προηγηθούν πριν την επόμενη επίσκεψη στο εργαστήριο. Αυτό θα γίνει ώστε να επαναλαμβάνει ο κάθε συμμετέχοντας την ίδια διατροφή τις 2 ημέρες που θα προηγούνται πριν από κάθε επόμενη επίσκεψη.

Στη 2η επίσκεψη θα γίνουν φυσιολογικές μετρήσεις και λήψη αίματος, καθώς επίσης θα δοθεί λιποϊκό οξύ (600 mg/ημέρα) ή NAC (10mg/Kg σωματικού βάρους) ή εικονικό φάρμακο (κάψουλες με αλεύρι) σε επαρκή ποσότητα για 4 εβδομάδες. Μετά το πέρας των 4 εβδομάδων οι εθελοντές θα επανέλθουν στο εργαστήριο όπου θα γίνει η δεύτερη αιμοληψία και φυσιολογικές μετρήσεις. Θα υπάρξει μια περίοδος 2 ή 4 εβδομάδων όπου δεν θα γίνει κάποια παρέμβαση. Στη συνέχεια, οι εθελοντές θα επαναλάβουν την ίδια διαδικασία άλλη μια φορά για το άλλο σκευάσματα που πρέπει να λάβουν συμπληρωματικά. Η ουσία που λαμβάνουν σε κάθε περίπτωση οι συμμετέχοντες, θα είναι γνωστή μόνο σε έναν ερευνητή και θα αποκαλυφθεί μετά το τέλος και των βιοχημικών αναλύσεων (διπλή τυφλή μελέτη).

### ***Κίνδυνοι και ενοχλήσεις***

**Αιμοληψία:**

Θα χρησιμοποιηθεί μία μικρή βελόνα σύριγγας για τη λήψη φλεβικού αίματος από τη μεσοβασιλική φλέβα. Υπάρχει πιθανότητα μικρού μώλωπα στο σημείο της αιμοληψίας ενώ ο εθελοντής μπορεί να αισθανθεί πόνο κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας και ζαλάδα ή τάσεις λιποθυμίας τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά από την αιμοληψία. Σε κάθε δείγμα η συνολική ποσότητα αίματος που θα ληφθεί από έμπειρο γιατρό θα είναι 10ml η οποία δεν θα έχει απολύτως καμία αρνητική συνέπεια.

**Δοκιμασία μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου:**

Θα νιώσετε την φυσιολογική κόπωση που προκαλεί η υπομέγιστη άσκηση. Δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος τραυματισμού κατά τη διάρκεια των δοκιμασιών. Παρ' όλα αυτά υπάρχει πρόβλεψη πρώτων βοηθειών και εκπαιδευμένο προσωπικό για κάθε ενδεχόμενο.

### ***Προσδοκώμενες ωφέλειες***

Τα ευρήματα από την εργασία θα δώσουν την δυνατότητα στους συμμετέχοντες να μάθουν ποιο είναι το ποσοστό του σωματικού λίπους, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και την ποιότητα της διατροφής τους.

### ***Δημοσίευση δεδομένων – αποτελεσμάτων***

Η συμμετοχή σου στην έρευνα συνεπάγεται ότι συμφωνείς με τη δημοσίευση των δεδομένων και των αποτελεσμάτων της, με την προϋπόθεση ότι οι πληροφορίες θα είναι ανώνυμες και δε θα αποκαλυφθούν τα ονόματα των συμμετεχόντων. Τα δεδομένα που θα συγκεντρωθούν θα κωδικοποιηθούν με αριθμό, ώστε το όνομα σου δε θα φαίνεται πουθενά.

### **Πληροφορίες**

Μη διστάσεις να κάνεις ερωτήσεις γύρω από το σκοπό ή/και τον τρόπο πραγματοποίησης της εργασίας. Αν έχεις κάποιες αμφιβολίες ή ερωτήσεις, ζήτησέ μας να σου δώσουμε πρόσθετες εξηγήσεις.

### **Ελευθερία συναίνεσης**

Η άδειά σου να συμμετάσχεις στην εργασία είναι εθελοντική. Είσαι ελεύθερος να μην συναινέσεις ή να διακόψεις τη συμμετοχή σου όποτε επιθυμείς.

Διάβασα το έντυπο αυτό και κατανοώ τις διαδικασίες που θα εκτελέσω. Συναινώ να συμμετέχω στην εργασία.

Ημερομηνία: \_\_/\_\_/\_\_

Ονοματεπώνυμο και  
υπογραφή συμμετέχοντος

Υπογραφή ερευνητή

Ονοματεπώνυμο και  
υπογραφή παρατηρητή

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

### Ερωτηματολόγιο υγείας

Όνοματεπώνυμο:

Ημερομηνία:

Παρακαλώ συμπληρώστε

1. Έχετε κάποιο πρόβλημα υγείας για το οποίο
  - A) είστε υπό φαρμακευτική αγωγή ναι [ ]      όχι [ ]
  - B) είστε υπό ιατρική παρακολούθηση ναι [ ]      όχι [ ]
  
2. Τα τελευταία 2 χρόνια, εξαιτίας κάποιας ασθένειας
  - A) επισκεφτήκατε το γιατρό σας ναι [ ]      όχι [ ]
  - B) επισκεφτήκατε εξωτερικά ιατρεία ναι [ ]      όχι [ ]
  - Γ) μείνατε στο νοσοκομείο ναι [ ]      όχι [ ]
  
3. Είχατε ποτέ κάποια από τις παρακάτω καταστάσεις;
  - A) Επιληψία ναι [ ]      όχι [ ]
  - B) Έκζεμα ναι [ ]      όχι [ ]
  - Γ) Διαβήτης ναι [ ]      όχι [ ]
  - Δ) Άσθμα ναι [ ]      όχι [ ]
  - E) Καρδιαγγειακά νοσήματα ναι [ ]      όχι [ ]
  - Z) Πεπτικά προβλήματα ναι [ ]      όχι [ ]
  - H) Προβλήματα γυναικολογικά ναι [ ]      όχι [ ]
  - Θ) Προβλήματα οστών και αρθρώσεων ναι [ ]      όχι [ ]
  - I) Προβλήματα ισορροπίας και συναρμογής ναι [ ]      όχι [ ]
  - K) Προβλήματα όρασης/ ακοής ναι [ ]      όχι [ ]
  - Λ) Προβλήματα θυρεοειδούς ναι [ ]      όχι [ ]
  - M) Ορμονικά προβλήματα ναι [ ]      όχι [ ]
  - N) Προβλήματα ήπατος και νεφρών ναι [ ]      όχι [ ]
  - Ξ) Μούδιασμα άκρων ναι [ ]      όχι [ ]
  - O) Άλλα προβλήματα ναι [ ]      όχι [ ]



4. Αν είστε γυναίκα

- |  |         |         |
|--|---------|---------|
| A) σχεδιάζετε να μείνετε έγκυος          | ναι [ ] | όχι [ ] |
| B) είστε η νομίζετε ότι είστε έγκυος     | ναι [ ] | όχι [ ] |
| Γ) παίρνετε χάπια αντισύλληψης ή ορμόνες | ναι [ ] | όχι [ ] |
| Δ) είστε στην εμμηνόπαυση                | ναι [ ] | όχι [ ] |

5. Κάποιος από τους συγγενείς πρώτου βαθμού είχε

- |                             |         |         |
|-----------------------------|---------|---------|
| A) Καρδιαγγειακά προβλήματα | ναι [ ] | όχι [ ] |
| B) Διαβήτη                  | ναι [ ] | όχι [ ] |
| Γ) Εγκεφαλικό               | ναι [ ] | όχι [ ] |
| Δ) Κάποια άλλη ασθένεια     | ναι [ ] | όχι [ ] |

6. Καπνίζετε αυτή την περίοδο

ναι [ ]      όχι [ ]

Έχετε καπνίσει ποτέ

ναι [ ]      όχι [ ]

Αν ναι, για πόσο καιρό κα πότε το κόψατε:

Πόσες μονάδες αλκοόλ πίνετε σε μια εβδομάδα:

7. Γυμνάζεστε

ναι [ ]      όχι [ ]

Πόσες φορές την εβδομάδα:

Αναφέρετε το είδος γυμναστικής:

Αν απαντήσατε ναι σε κάποια από τις ερωτήσεις, παρακαλώ περιγράψτε εν συντομία

.....

.....

.....

.....

.....

☐ Δηλώνω ότι είμαι σωματικά υγιής και δεν πάσχω από κάποια πάθηση, βλάβη, ασθένεια ή αναπηρία που θα μπορούσε να εμποδίσει τη συμμετοχή μου στην πειραματική διαδικασία.

☐ Αναγνωρίζω ότι έχω εξετασθεί και ο γιατρός μου έχει δώσει την άδεια να συμμετάσχω, ή έχω αποφασίσει να συμμετάσχω στην πειραματική διαδικασία χωρίς την έγκριση του γιατρού μου. Αναλαμβάνω κάθε ευθύνη για την συμμετοχή μου.

Ημ/νία

Υπογραφή ερευνητή

Υπογραφή συμμετέχοντα

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

### Ερωματηματολόγιο Φυσικής Δραστηριότητας (ΙΡΑΟ)

Παρακάτω ακολουθούν ερωτήσεις σχετικά με την άσκηση που κάνεις στον ελεύθερο χρόνο σου

Σκέψου το χρόνο που αφιέρωσες στο διάστημα των τελευταίων 7 ημερών για να ασκηθείς στον ελεύθερο χρόνο σου. Σκέψου μόνο τις φορές που έκανες άσκηση για τουλάχιστον 10 λεπτά κάθε φορά.

1. Κατά τη διάρκεια των **τελευταίων 7 ημερών**, πόσες ημέρες έκανες **στον ελεύθερο χρόνο σου** άσκηση **υψηλής έντασης** (ανέπνεες πολύ πιο δύσκολα από ότι συνήθως), όπως προπόνηση με βάρη, γρήγορη ποδηλασία, τρέξιμο, αθλοπαιδιές (π.χ., ποδόσφαιρο, μπάσκετ)

\_\_\_\_\_ ημέρες ανά εβδομάδα

☐ Καμία έντονη άσκηση → προχωρήστε στην ερώτηση 3

2. Πόσο χρόνο συνήθως αφιέρωσες για να κάνεις άσκηση **υψηλής έντασης** σε μία από αυτές τις ημέρες;

\_\_\_\_\_ ώρες την ημέρα ή

\_\_\_\_\_ λεπτά την ημέρα

3. Κατά τη διάρκεια των **τελευταίων 7 ημερών**, πόσες μέρες έκανες **στον ελεύθερο χρόνο σου** άσκηση **μέτριας έντασης** (ανέπνεες λίγο πιο δύσκολα από ότι συνήθως), όπως κολύμπι, ποδηλασία σε κανονικό ρυθμό, γρήγορο περπάτημα. Σκέψου μόνο τις φορές που έκανες άσκηση για τουλάχιστον 10 λεπτά. **Μην συμπεριλάβεις το περπάτημα.**

\_\_\_\_\_ ημέρες ανά εβδομάδα

☐ Καμία άσκηση μέτριας έντασης → προχωρήστε στην ερώτηση 5

4. Πόσο χρόνο συνήθως αφιέρωσες για να κάνεις άσκηση **μέτριας έντασης** σε μία από αυτές τις ημέρες;

\_\_\_\_\_ ώρες την ημέρα ή

\_\_\_\_\_ λεπτά την ημέρα

☐ Δεν γνωρίζω/ Δεν είμαι σίγουρος/η

**5. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες ημέρες έκανες στον ελεύθερο χρόνο σου περπάτημα για τουλάχιστον 10 λεπτά;**

\_\_\_\_\_ **ημέρες ανά εβδομάδα**

☐ Καθόλου περπάτημα

**6. Πόσο χρόνο συνήθως αφιέρωσες περπατώντας σε μία από αυτές τις ημέρες;**

\_\_\_\_\_ **ώρες την ημέρα ή**

\_\_\_\_\_ **λεπτά την ημέρα**

☐ Δεν γνωρίζω/ Δεν είμαι σίγουρος/η

**7. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσο χρόνο καθίσατε σε μια συνηθισμένη ημέρα της εβδομάδας;**

\_\_\_\_\_ **ώρες την ημέρα ή**

\_\_\_\_\_ **λεπτά την ημέρα**

☐ Δεν γνωρίζω/ Δεν είμαι σίγουρος/η